

Production and function of endothelial nitric oxide in the arterial and venous system : emphasis on antithromboembolic activity in vivo

Citation for published version (APA):

Broeders, M. A. W. (2002). *Production and function of endothelial nitric oxide in the arterial and venous system : emphasis on antithromboembolic activity in vivo*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20021205mb>

Document status and date:

Published: 01/01/2002

DOI:

[10.26481/dis.20021205mb](https://doi.org/10.26481/dis.20021205mb)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

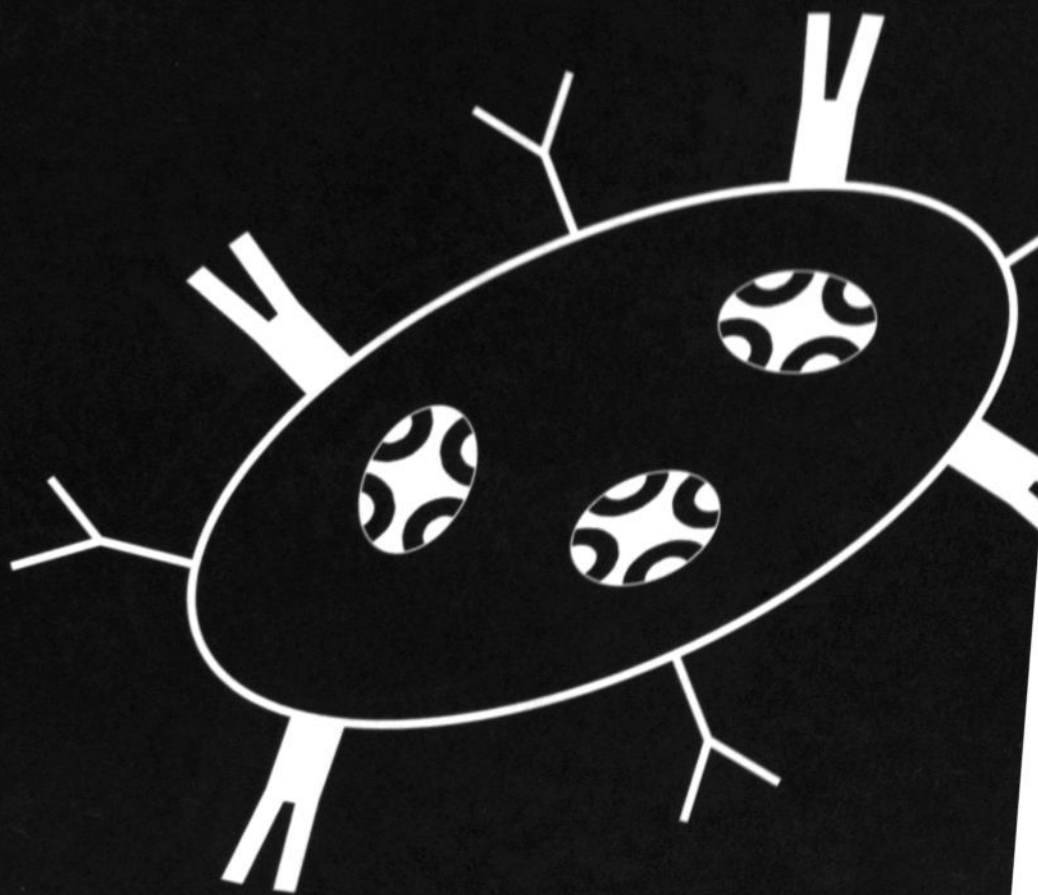
If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

Summary



Fundamental discoveries in vascular biology have led to the recognition that endothelial-derived nitric oxide (NO) is a major factor that mediates a great number of phenomena, all contributing to normal vessel anatomy and function. In many cardiovascular diseases, the bioavailability of NO is decreased, which may contribute to vasospasm, thrombus formation and intimal thickening, ultimately leading to ischemia and infarction. The studies in this thesis suggest that differences in mechanisms of production and antithromboembolic function of endothelial NO exist between the arterial and venous system. After a general introduction (**Chapter 1**) and a review of the literature on production and functions of nitric oxide (**Chapter 2**), the experimental studies are described (Chapters 3-5) and discussed (**Chapter 8**).

In the three studies on antithromboembolic function of NO (Chapters 3-5) a thromboembolic reaction, ie the formation of an intravascular thrombus and subsequent embolization, was induced in microvessels of the rabbit mesentery. The thromboembolic reaction is known to be different in arterioles and venules, the period of embolization (ie, the time from vessel wall injury to breaking off of the last embolus) being two to eight times longer in arterioles than in venules. Based on previous findings, it was hypothesized that functional differences in anti- and prothrombotic properties of the vessel wall may be responsible for the difference in thromboembolic reaction in these vessels.

Both platelet activating and inhibiting prostaglandins (for example, thromboxane A_2 [TXA_2] and prostacyclin [PGI_2]) play a more important role in thromboembolism in arterioles than in venules, possibly though a difference in prostaglandin synthetic capacity between arteriolar and venular endothelium. Because the difference in embolization between arterioles and venules cannot be explained by the different role of prostaglandins in these vessels, in this thesis the role of NO was studied. It was shown that NO is more important in protecting against prolonged thromboembolism in venules than in arterioles (**Chapter 3**). The observed effects on embolization in venules cannot be explained by differences in wall shear rate. It was argued that a lower bioavailability of NO in arterioles is a possible explanation, which may be due to the scavenging effect of superoxides.

An interesting additional finding of the study presented in Chapter 3 was that NO synthase inhibition abolished the difference in duration of embolization between arterioles and venules. Thus, the more important functional role of NO in venules, as compared to arterioles, provides a possible explanation for the difference in thromboembolic reaction normally found between the two vessel types.

At a site of wall injury antithrombotic endothelium-derived mediators (eg, PGI_2 and NO) are probably produced simultaneously and activated platelets are likely to be exposed to a combination of both. This combination may exert a more pronounced antithrombotic effect than

expected on the basis of their individual antithrombotic effects, because *in vitro* studies have shown that PGI₂ and NO released by cultured endothelial cells can act synergistically in the inhibition of platelet aggregation. Because it is unknown whether such a synergistic interaction is also effective *in vivo* and whether this interaction, if any, differs between vessel types, this question was dealt with in **Chapter 4** of this thesis. Combined actions of NO and prostaglandins inhibit embolization in a synergistic manner in arterioles. There was no such synergistic effect in venules. In addition, it was found that NO and prostaglandins play an important role in counter-acting wall shear rate-enhanced platelet activation in arterioles. In venules other as yet unidentified antithromboembolic substances are likely to oppose wall-shear rate enhanced platelet activation.

Taken together, in arterioles the antithromboembolic effect of endogenous NO alone is negligible, but its effect is pronounced in the presence of endogenous prostaglandins, provided that sufficient NO is produced to activate the arachidonic acid/prostaglandin pathway. An additional possible element is that, unlike in venules, the balance between antithromboembolic and prothromboembolic properties of the wall is more towards identified prothromboembolic factors (TXA₂) and possibly as yet unidentified prothromboembolic factors (eg, tissue factor or ADP) in arterioles. The exclusive presence of rolling leukocytes in venules, but not in arterioles, may offer an alternative explanation for the difference in thromboembolism between the two vessel types, either through a direct interaction between leukocytes and platelets or indirectly through involvement of vascular cells.

Hypercholesterolemia is an important risk factor for atherosclerosis, which affects the arterial system and may ultimately lead to ischemia and infarction. Most of these disorders result from thromboembolic processes at the site of the lesion. The vascular lesion plays an important role in these processes, but the role of hypercholesterolemia, as such, in thromboembolic events is less clear. Besides, the mediators involved in hypercholesterolemia-related thromboembolic events are, as yet, not well known. In our study described in **Chapter 5** evidence was provided for a pronounced stimulating effect of diet-induced hypercholesterolemia on *in vivo* thrombus formation and subsequent thromboembolization in arterioles, but not in venules. In arterioles the effects of hypercholesterolemia on embolization, but not on thrombus formation, can be completely reversed by activating NO synthesis with L-arginine. Effects of increased plasma cholesterol on thromboembolism in arterioles may be explained by a loss of NO/prostaglandin synergism.

In the second part of this thesis we focused on mechanisms of NO synthase (NOS) activation and production of vascular NO in the macrocirculatory system.

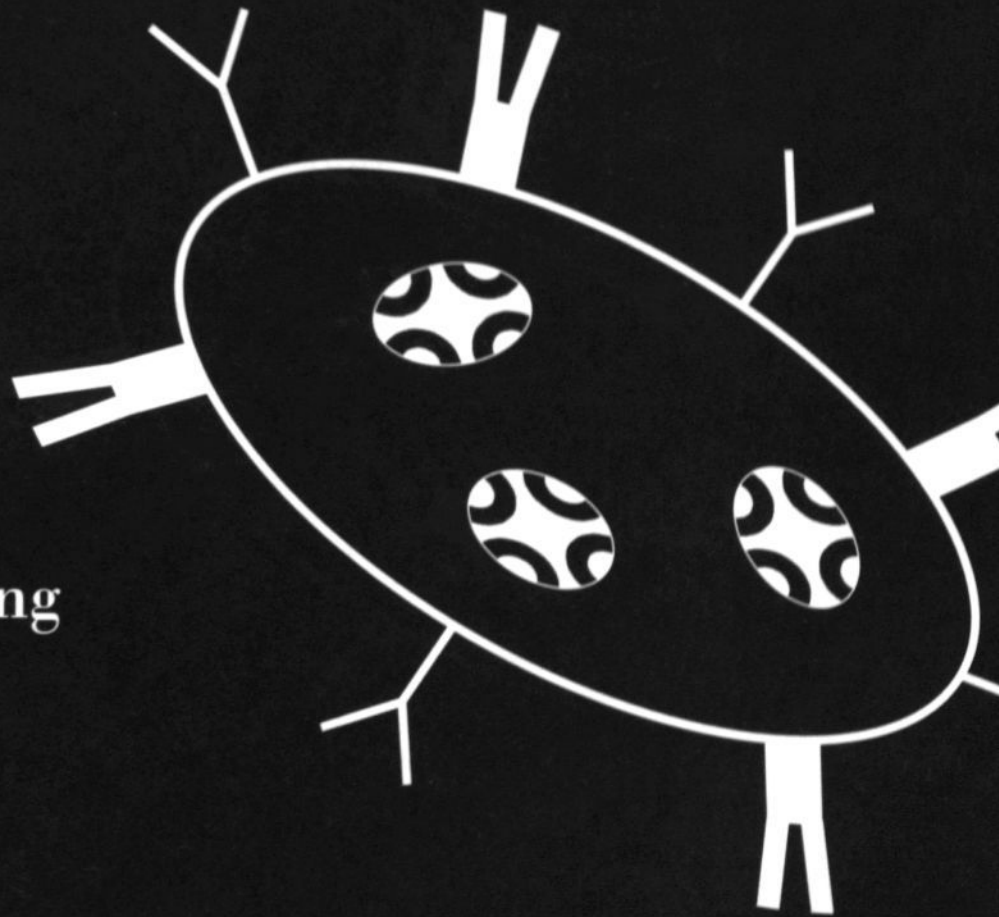
Graft failure is one of the major causes of recurrent angina after coronary artery bypass grafting. Endothelial NO inhibits smooth muscle cell proliferation, reducing the chance of vascular intimal thickening which is an important cause of late coronary vein graft occlusion. In the study presented in **Chapter 6** we investigated whether the superior long-term patency of the internal mammary artery in human coronary bypass grafting compared with that of the saphenous vein could be explained by different levels of NO production. The baseline endogenous NO appeared to be 50% higher in internal mammary artery than in saphenous vein. Previously, it was shown that vascular endothelial growth factor (VEGF) and the VEGF-receptors *KDR (Flk-1)* and *Flt-1* are expressed in both internal mammary artery and saphenous vein and that VEGF-receptor density was higher in internal mammary artery than in saphenous vein. Therefore, we also investigated the influence of VEGF on NO release in both internal mammary artery and saphenous vein. VEGF augmented NO production by approximately 50% in saphenous vein and 100% in internal mammary artery. Based on this study it was concluded that VEGF augments endothelial constitutive NOS-dependent NO release to a greater extent in internal mammary artery than in saphenous vein. Differences in NO production between internal mammary artery and saphenous vein are not caused by a higher vascular expression of NOS. The previously reported higher VEGF-receptor density in internal mammary artery than in saphenous vein may explain the higher VEGF-stimulated NO production in internal mammary artery. These findings may help to explain the long-term superiority of internal mammary artery versus saphenous vein as a conduit for coronary artery bypass.

Because in many cardiovascular diseases the capacity of the endogenous L-arginine/NO system is decreased, an obvious therapeutic measure would be the pharmacological stimulation of this system. One of the third-generation β -blockers, nebivolol, has been shown to cause vasodilation, which is potentially mediated by increased NO production. In **Chapter 7** a study is presented to explore whether nebivolol indeed induces vascular NO production and to obtain insight into the mechanism underlying this enhanced NO production, if any. *In vivo* metabolized nebivolol, but not nebivolol itself, indeed increased NO production from isolated mouse aorta. This phenomenon was dependent on the presence of endothelium and involved endothelial β 2-adrenoceptor ligation with a subsequent rise in endothelial free intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and endothelial NOS-dependent NO production. In addition, it was shown that selective pharmacological stimulation of vascular β 2-receptors resulted in an augmentation of NO release similar to that of metabolized nebivolol. In line with these results the unique presence of β 2-adrenoceptors, but not of β 1-adrenoceptors, on vascular endothelial cells was demonstrated. Endothelial NO production stimulated by endothelial β -adrenergic receptor ligation may well be an important

mechanism in normal vascular human physiology. Therefore, endothelial β -adrenoceptor mediated increase of endothelial NO production might become an additional therapeutic target in disorders associated with “endothelial dysfunction” and with preserved β -receptor mediated NO-dependent vasodilation.

The obtained insights into production and function of NO enhance our understanding of the complex multifactorial origin of thromboembolic processes and intimal thickening in the arterial and venous system. Furthermore, the present thesis provides strong experimental evidence for a large heterogeneity in function between arterioles and venules as well as between arteries and veins. The data presented in this thesis indicate that enhancing endothelial NO production protects against dietary cholesterol-induced thromboembolism, which is a well-know complication in atherosclerosis. Selective β_2 -adrenergic receptor- or VEGF-mediated increase of endothelial NO production might become an additional therapeutic target in disorders associated with “endothelial dysfunction”.

Samenvatting



Door endotheel geproduceerd stikstof oxide (NO) speelt een belangrijke rol bij een groot aantal processen die bijdragen aan de normale anatomie en functie van bloedvaten. In veel cardiovasculaire ziekten is de biologische beschikbaarheid van NO verminderd. Dit kan bijdragen aan intima proliferatie, vasoconstrictie en trombusvorming en het kan leiden tot verminderde doorgankelijkheid van bloedvaten en uiteindelijk tot ischemie, infarct (bijvoorbeeld hartinfarct of herseninfarct) en sterfte. In dit proefschrift wordt aangetoond dat er grote verschillen bestaan tussen het arteriële en veneuze systeem met betrekking tot mechanismen van productie en antitrombo-embolische functie van endotheliaal NO. Na een algemene inleiding (**Hoofdstuk 1**) en een overzicht van de literatuur over productie en functies van NO (**Hoofdstuk 2**), volgt een beschrijving van de experimentele studies (Hoofdstukken 3-7) en een discussie van de bevindingen (**Hoofdstuk 8**).

Interacties tussen bloed en een beschadigde vaatwand resulteren in de vorming van een trombus, mogelijk gevolgd door embolisatie. Antitrombogene en trombogene eigenschappen van endotheel spelen tijdens dergelijke interacties een belangrijke rol. De betrokkenheid van endotheel bij trombotische processen wordt veelal *in vitro* onderzocht, aan cellen die geïsoleerd zijn uit grote bloedvaten. De condities waarin geïsoleerde endotheelcellen zich *in vitro* bevinden zijn echter niet in overeenstemming met hun natuurlijke omgeving, hetgeen het functioneren van deze cellen zeker beïnvloedt. Bovendien is, zowel *in vitro* als *in vivo*, aangetoond dat antitrombogene eigenschappen van endotheel niet in alle bloedvaten gelijk zijn, zodat het van belang is om functies van endotheel in verschillende bloedvaten met elkaar te vergelijken. Het onderzoek in dit proefschrift heeft zich gericht op de antitrombogene eigenschappen van endotheel *in vivo* in twee typen bloedvaten, te weten arteriolen en venulen. De nadruk lag daarbij op de productie en de rol van NO en van antitrombogene prostaglandines tijdens een trombo-embolische reactie. Zowel NO als deze prostaglandines zijn antitrombogene substanties afkomstig uit endotheel.

In het onderzoek werd steeds gebruik gemaakt van een in ons laboratorium ontwikkeld proefdiermodel. In het mesenterium van het geanesthezeerde konijn werd de wand van arteriolen en venulen zeer lokaal beschadigd met een glazen micropipet. Op deze wijze werd in alle bloedvaten de onmiddellijke vorming van een trombus geïnduceerd, die de bloeding stopte. De trombus groeide daarna meestal aan in stroomafwaartse richting, totdat het nieuw gevormde, stroomafwaartse stuk emboliseerde; dit embolisatieproces herhaalde zich gedurende bepaalde tijd. Het stabiele, niet emboliserende deel van de trombus bleef steeds op zijn plaats en veranderde niet of nauwelijks in grootte. Deze trombo-embolische reactie werd met behulp van intravitaal microscopie bestudeerd en gekwantificeerd; ook de lokale en systemische hemodynamische condities werden gemeten.

Uit eerder onderzoek was reeds bekend dat de trombo-embolische reactie in arteriolen en venulen verschillend is: de duur van embolisatie (dat wil zeggen, de tijd verstreken vanaf beschadiging van de vaatwand tot het afbreken van de laatste embolus) is twee tot acht maal langer in arteriolen dan in venulen. Direct voorafgaand aan dit project werd een studie verricht naar de “overall” rol van prostaglandines tijdens een trombo-embolische reactie. Met behulp van een hoge dosering van de cyclo-oxygenase-remmer aspirine werd de vorming van zowel het trombogene tromboxaan A_2 (TXA_2) als van de antitrombogene prostaglandines uit de vaatwand, zoals het prostacycline (PGI_2), geremd. Dit bleek de embolisatie in arteriolen significant te verlengen, terwijl geen effect werd gevonden in venulen. Vervolgens werd onderscheid gemaakt tussen de bijdrage van de antitrombogene prostaglandines en TXA_2 : de werking van TXA_2 kon selectief uitgeschakeld worden met behulp van sulotroban, een selectieve TXA_2 -receptor blokker bij konijnen. Sulotroban bleek de embolisatie in arteriolen significant te remmen, terwijl in venulen geen effect werd gevonden. Net als aspirine had ook sulotroban geen effect op de trombusvorming en op de hemodynamische condities. Deze resultaten geven aan dat TXA_2 een grotere rol speelt tijdens het trombo-embolische proces in arteriolen dan in venulen. Dit duidt erop dat niet alleen TXA_2 geproduceerd door bloedplaatjes een rol speelt; de bijdrage van het uit bloedplaatjes afkomstige TXA_2 zou in arteriolen en venulen gelijk moeten zijn gezien de overeenkomstige grootte van trombus en emboli in beide typen vaten (eerder onderzoek). Ook cellen in de vaatwand zijn in staat TXA_2 te produceren; blijkbaar wordt er meer TXA_2 geproduceerd door arteriolaire dan door venulaire vaatwandcellen. Tezamen kan uit de aspirine- en sulotroban-data geconcludeerd worden dat zowel plaatjes-inhiberende als plaatjes-stimulerende prostaglandines in arteriolen een grotere rol spelen in de plaatjes-vaatwand interacties na een vaatwand-beschadiging dan in venulen. Dit duidt op een functioneel verschil tussen arterielaire en venulaire endotheel *in vivo*; beschadigd/gestimuleerd endotheel in arteriolen lijkt meer prostaglandines te produceren dan venulair endotheel.

Gebaseerd op deze bevindingen, veronderstelden we dat functionele verschillen in anti- en protrombotische eigenschappen van de vaatwand het verschil in trombo-embolische reactie tussen deze microvaten zou kunnen verklaren. Omdat het verschil in embolisatie tussen arteriolen en venulen niet kan worden verklaard door de verschillende rol van prostaglandines in deze microvaten, werd in dit proefschrift de rol van NO bestudeerd. Met behulp van L-NA (N^G -nitro-L-arginine, een NO synthase [NOS] remmer) werd gevonden dat endogeen NO beschermt tegen langdurige embolisatie in venulen (**Hoofdstuk 3**). In arteriolen had remming van NOS geen effect op embolisatie. Het venulaire effect wordt niet veroorzaakt door veranderende hemodynamische condities omdat zowel in de venulen als in de arteriolen NOS remming geen invloed had op de hemodynamische parameters. Een grotere mate van beschikbaarheid van het geproduceerde NO in venulen lijkt een waarschijnlijke verklaring, gezien het feit dat er aanwijzingen zijn dat in het

mesenterium (van de rat) meer zuurstof radicalen geproduceerd worden in arteriolen dan in venulen; zuurstof radicalen inactiveren NO en verminderen dus de "bioavailability" van het NO.

Een interessante bijkomende bevinding van deze studie is dat remming van NOS het verschil in embolisatieduur tussen arteriolen en venulen doet verdwijnen. Mogelijk vormt de meer belangrijke rol van NO in venulen, vergeleken met arteriolen, een verklaring voor het verschil in trombo-embolische reactie tussen de twee vaattypen.

Ter plaatse van een vaatwand-beschadiging worden antitrombotische endotheliale substanties, zoals PGI_2 en NO, waarschijnlijk gelijktijdig geproduceerd; geactiveerde bloedplaatjes worden dan blootgesteld aan een combinatie van beide. Deze combinatie heeft mogelijk een groter antitrombotisch effect dan wat is te verwachten op basis van hun individuele antitrombotische effecten. *In vitro* studies hebben namelijk aangetoond dat een combinatie van endotheliaal PGI_2 en NO op synergistische wijze de aggregatie van bloedplaatjes remt. Omdat onbekend is of zo'n synergistische interactie ook *in vivo* werkzaam is en of deze interactie, indien aanwezig, verschilt tussen arteriolen en venulen, werd dit bestudeerd in het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 4** van dit proefschrift. Middels gecombineerde remming van de productie van prostaglandines (met behulp van een hoge dosis aspirine) en het NO (met behulp van L-NA) werd onderzocht of er *in vivo* sprake is van een synergistisch, antitrombogene effect van beide tijdens een trombo-embolische reactie, wederom in arteriolen en venulen. Deze gecombineerde remming van prostaglandine- en NO-productie resulteerde in arteriolen in een dramatische verlenging van de embolisatieperiode, een effect dat duidelijk groter was dan de som van de effecten van aspirine en L-NA afzonderlijk. In venulen, daarentegen, was het effect van de combinatie niet groter dan het effect van L-NA alleen. Dit duidt erop dat de combinatie van endogene prostaglandines en NO een synergistisch, antitrombogene effect heeft in arteriolen, maar niet in venulen. Uit de literatuur blijkt dat NO *in vitro* in staat is cyclo-oxygenase-activiteit te stimuleren; wanneer dit een concentratie-afhankelijk effect zou zijn dat ook *in vivo* werkzaam is, dan zou dit onze bevindingen kunnen verklaren. Een andere opvallende bevinding in deze studie was dat er in arteriolen van de konijnen waarin zowel prostaglandine- als NO-productie geremd werd, sprake was van een positieve relatie tussen de lokale gereduceerde snelheid, hetgeen een maat is voor de lokale afschuifsnelheid of "wall shear rate", en de mate van embolisatie. Dit was niet het geval in de arteriolen van de overige groepen, en ook niet in venulen. Dit betekent dat, onder normale omstandigheden, in arteriolen het trombogene effect van de afschuifsnelheid onderdrukt wordt door het synergistische, antitrombogene effect van endogene prostaglandines en NO. In venulen zijn blijkbaar nog andere antitrombogene substanties werkzaam.

Samenvattend is in arteriolen het antitrombo-embolische effect van endogeen NO alléén verwaarloosbaar. Daarentegen is het effect van NO zeer uitgesproken in de aanwezigheid van endogene prostaglandines, op voorwaarde dat voldoende NO wordt geproduceerd om de

arachidonzuur/prostaglandine cascade te activeren. Een bijkomend element is dat, anders dan in venulen, in arteriolen de balans tussen antitrombo-embolische en protrombo-embolische eigenschappen van de vaatwand meer in protrombo-embolische richting neigt. De exclusieve aanwezigheid van rollende leukocyten in venulen, maar niet in arteriolen, kan een alternatieve verklaring bieden voor het verschil in trombo-embolische reactie tussen de twee vaattypen, ofwel door een directe interactie tussen leukocyten en bloedplaatjes danwel indirect door betrokkenheid van vaatwandcellen.

Hypercholesterolemische patiënten en dieren hebben een verhoogd risico op atherosclerose, een aandoening van het arteriële systeem, welke uiteindelijk kan leiden tot ischemie en infarctering. Meestal wordt dit veroorzaakt door trombo-embolische processen ter hoogte van de vaatwandlaesie. Deze vaatwandlaesie speelt een belangrijke rol in deze processen, maar de rol van hypercholesterolemie, op zich, in trombo-embolische processen is minder duidelijk. Daarnaast zijn de mediators die bij trombo-embolische processen in hypercholesterolemie een rol spelen, tot op heden, niet goed bekend. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat chronische hypercholesterolemie bij konijnen leidt tot afgenomen endogene NO-productie in zowel arteriën als venen. Gebruik makend van ons eigen model hebben wij onderzocht wat de consequentie van hypercholesterolemie is voor de trombo-embolische reactie in arteriolen en venulen, en welke rol NO hierbij speelt (**Hoofdstuk 5**). Konijnen kregen gedurende de twee weken voorafgaand aan de experimenten voedsel met een relatief hoog cholesterol-gehalte (0.4%), wat leidde tot een significant verhoogde cholesterol-spiegel in het bloed; met name de LDL ("low-density lipoprotein")-concentratie was toegenomen ten opzichte van normaal. Dit veroorzaakte een zeer significante verlenging van de embolisatie-periode in arteriolen, terwijl in de venulen geen effect werd gevonden. Bovendien werd in de arteriolen de trombus groter. Blijkbaar heeft hypercholesterolemie in arteriolen een bloedplaatjes-stimulerend effect tijdens zowel de -primaire- fase van trombusvorming als de -secundaire- embolisatiefase. Superfusie van het mesenterium van de hypercholesterolemische konijnen met een overmaat aan L-arginine, het substraat voor endogene NO-productie, bracht de arteriolaire embolisatie, maar niet de trombusgrootte terug naar controle-niveau; wederom werd geen effect gevonden in de venulen. Hypercholesterolemie had geen effect op lokale hemodynamische condities in beide typen bloedvaten.

Uit de literatuur is bekend dat hypercholesterolemie gepaard kan gaan met verhoogde vasculaire productie van zuurstof radicalen, welke vervolgens NO kunnen inactiveren. De resultaten van onze studie suggereren dat dit effect zich met name voordoet in arteriolen en niet in venulen. Dit zou kunnen verklaren waarom de trombo-embolische reactie in venulen niet verandert onder invloed van hypercholesterolemie. In arteriolen heeft een afname van de NO-beschikbaarheid alléén geen significant effect op de reactie (zie Hoofdstuk 3). Daarom moet de hypercholesterolemie nog andere trombogene effecten op de arteriolaire vaatwand hebben. Aangezien

het arteriële effect van de verhoogde cholesterol-spiegel veel lijkt op dat van gecombineerde remming van NO- en prostaglandine-productie, zou het zo kunnen zijn dat ook de productie en/of de functie van antitrombotische prostaglandines geremd is in deze vaten.

In het tweede deel van dit proefschrift hebben we ons gericht op mechanismen van NOS-activatie en productie van vasculair NO in het macrocirculatoire systeem.

De bevindingen in Hoofdstuk 3 hebben geleid tot het opstarten van een nieuw stuk onderzoek. Dit extra onderzoek was gericht op A-V verschillen op het gebied van NO-productie in de humane situatie. Het betrof een onderzoek naar de productie van NO en de aanwezigheid en lokalisatie van NO-producerende enzymen ("endothelial cell" [ec]-NOS en "inducible" [i]-NOS) in de wand van humane bloedvaten die gebruikt worden als omleidingsvaten tijdens coronaire bypass chirurgie (arterieel: arteria mammaria interna; veneus: vena saphena). Gebruik van arteria mammaria interna blijkt in de klinische praktijk succesvoller te zijn dan gebruik van vena saphena; een verschil in NO-productie en/of activiteit zou hieraan kunnen bijdragen. Endotheliaal NO remt proliferatie van gladde spiercellen, welke dan mogelijk het proces van intima verdikking inhibeert; intima proliferatie is een belangrijke oorzaak van late bypass occlusie. In Hoofdstuk 6 onderzochten we of de superieure "patency" van de arteria mammaria interna in humane coronaire bypass chirurgie vergeleken met die van de vena saphena kan worden verklaard door een verschil in NO-productie. Dit onderzoek wees uit dat de basale NO-productie in humane arteria mammaria interna segmenten 50% hoger was dan in humane SV segmenten. Vervolgens onderzochten we de invloed van VEGF op NO-productie in zowel arteria mammaria interna als vena saphena. VEGF verhoogde NO-productie ongeveer 50% in vena saphena en 100% in arteria mammaria. Gebaseerd op deze studie werd geconcludeerd dat endotheliaal constitutief NOS-afhankelijke NO-productie meer verhoogd wordt door VEGF in arteria mammaria interna dan in vena saphena. Verschillen in NO-productie tussen arteria mammaria interna en vena saphena worden niet veroorzaakt door een hogere vasculaire expressie van ec-NOS of i-NOS; ec-NOS is in gelijke mate aanwezig in de endotheelcel-laag van arteria mammaria interna en vena saphena, terwijl in geen van beide vaten sprake is van i-NOS expressie. De eerder beschreven hogere VEGF-receptor densiteit (*KDR (Flk-1)* en *Flt-1*) in arteria mammaria interna dan in vena saphena kan de hogere VEGF-gestimuleerde NO-productie in deze arteriën verklaren. Samengevat blijkt uit deze resultaten dat hetzij de activiteit van het ec-NOS, hetzij de biologische beschikbaarheid van het geproduceerde NO verschilt tussen de twee typen bloedvaten, en dat dit verschil waarschijnlijk bijdraagt aan het verschil in succes bij gebruik van deze vaten tijdens coronaire bypass chirurgie.

In veel cardiovasculaire ziekten is de capaciteit van het endogene L-arginine/NO systeem verminderd. Een voor de hand liggend doel van therapie lijkt dus dit systeem farmacologisch te stimuleren. Van één van de derde-generatie β -blokkers, nebivolol, is aangetoond dat het vasodilatatie veroorzaakt, welke mogelijk wordt gemedieerd door verhoogde NO-productie. In **Hoofdstuk 7** wordt onderzocht of nebivolol inderdaad vasculaire NO-productie stimuleert. *In vivo* gemetaboliseerd nebivolol, maar niet nebivolol zelf, verhoogde inderdaad de NO-productie in de geïsoleerde aorta van de muis. Vervolgens werd getracht inzicht te verwerven in het onderliggende mechanisme. Het fenomeen bleek afhankelijk van de aanwezigheid van endotheel. Endotheliaal β 2-adrenoceptor binding bleek erbij betrokken te zijn, met een daarop volgende stijging in endotheliaal vrij intracellulair Ca^{2+} en tevens ec-NOS-afhankelijke NO-productie. Tevens werd aangetoond dat selectieve farmacologische stimulatie van vasculaire β 2-receptoren met salbutamol resulteerde in een verhoging van NO-productie vergelijkbaar met die van gemetaboliseerd nebivolol. In overeenstemming met deze resultaten werd de aanwezigheid van endotheliale β 2-adrenoceptoren aangetoond; β 1-adrenoceptoren waren niet aanwezig op vasculair endotheel. Endotheliale NO-productie, gestimuleerd door endotheliale β -adrenerge receptor binding, zou goed een belangrijk mechanisme in de normale vasculaire fysiologie kunnen zijn. Daarom zou endotheliale β -adrenoceptor gemedieerde verhoging van endotheliale NO-productie zeer goed een additioneel therapeutisch doel kunnen vormen bij ziekten geassocieerd met "endotheliale dysfunctie", waarbij β -receptor gemedieerde NO-afhankelijke vasodilatatie behouden is gebleven.

Samenvattend kan worden gesteld dat de antitrombogene eigenschappen van endotheel zeer verschillend blijken te zijn in het arteriële en veneuze systeem. In arteriolen blijkt de afzonderlijke antitrombogene rol van prostaglandines uit het endotheel groter te zijn dan die van het endotheliale NO; het gezamenlijke effect blijkt echter de som van beide effecten afzonderlijk duidelijk te overtreffen: er lijkt sprake te zijn van potentiëring van het antitrombogene prostaglandine-effect door NO. In venulen is dit niet het geval; hier is de antitrombogene rol van NO veruit het belangrijkste. Dit verschil in antitrombogene eigenschappen van endotheel blijkt ook zijn consequenties te hebben in pathologische condities, zoals hypercholesterolemie: de effecten hiervan zijn duidelijk groter in arteriolen dan in venulen. Het verhogen van de endotheliale NO-productie beschermt tegen de hypercholesterolemie-geïnduceerde trombo-embolische reactie, welke een bekende complicatie bij atherosclerose is. Al met al wijzen de functionele studies in dit proefschrift uit dat het van het grootste belang is, ook vanuit klinisch oogpunt, om (anti)trombogene eigenschappen van endotheel ook *in vivo* te onderzoeken, om zodoende inzicht te verwerven in de hoge mate van heterogeniteit die er in dit opzicht bestaat. Tussen grote, humane arteriën en venen blijken ook verschillen te bestaan in mate van NO-productie en/of -beschikbaarheid; een

dergelijk verschil kan medeverantwoordelijk zijn voor verschillen in succes-kans wanneer dergelijke vaten worden gebruikt voor coronaire bypass chirurgie. Selectieve β_2 -adrenerge receptor- of VEGF-gemedieerde verhoging van endotheliale NO-productie zou goed een additioneel therapeutisch doel kunnen worden in ziekten geassocieerd met "endotheliale dysfunctie".